Elimination von chemisch induzierten Chromosomenaberrationen in der späten Embryogenese bei Mäusen

Ingeborg Friedrich

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536502_0038

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf
Direktor: o. Prof. Dr. Gunter Röhrborn

Elimination von chemisch induzierten Chromosomenaberrationen in der späten Embryogenese bei Mäusen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Ingeborg Friedrich
1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Straßburg
Referent
gez.: Prof. Dr. Röhrborn
Korreferent
gez.: Prof. Dr. Ohnesorge

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung 1
2. Pharmakologie des Trenimon 5
2.1. Chemie 5
2.2. Wirkungsmechanismus 7
2.3. Mutagenität 8
2.4. Klinische Anwendung 10
3. Material und Methode 11
3.1. Versuchstiere 11
3.2. Chemikalien 11
3.2.1. Medikamente 11
3.2.2. Medien und Chemikalien für die Kurzzeitkultur 11
3.2.3. Lösungen zur Herstellung der mikroskopischen Präparate 12
3.3. Versuchsaufbau 12
3.4. Chromosomendarstellung 13
3.4.1. Präparationsmethode 13
3.4.2. Färbung 16
3.5. Auswertungskriterien 17
3.6. Fotographische Dokumentation 17
4. Ergebnisse 18
4.1. Allgemeines 18
4.2. Kontrolle 18
4.3. Versuch 20
5. Diskussion 25
5.1. Färbemethode 25

5.2. Elimination induzierter Chromosomen-
aberrationen 27
6. Zusammenfassung 34
7. Literaturverzeichnis 35
Danksagung
Lebenslauf

1. Einleitung

Chromosomenaberrationen werden bei etwa 50 von 10000 Neugeborenen nachgewiesen. Bei 37 von ihnen sind die Mutationen neu entstanden, sei es spontan, chemisch oder physikalisch induziert. Bei den restlichen sind sie ererbt. Darüberhinaus sind Chromosomenaberrationen die Ursache von mindestens 36% aller Fehlgeburten (Carr, 1970). Da 15 - 20% aller Schwangerschaften mit einem Spontanabort enden (WHO-Bericht Nr. 461 "Spontaneous and Induced Abortions", 1970, zitiert nach Röhrborn, 1974) wird vermutet, daß ungefähr 7% aller menschlichen Zygoten Chromosomenaberrationen haben. Ihre Zahl ist aber wahrscheinlich noch größer, weil die präimplantativen und frühen postimplantativen Eiverluste nicht erkennbar sind. Auf Grund dieser hohen Mutationsrate ist es interessant festzustellen, in welchem Maße und vor allem in welchem Stadium der Embryonalentwicklung eine Elimination der Feten und Embryonen mit Chromosomenaberrationen stattfindet. Dazu wurden an menschlichen Fehlgeburten Untersuchungen durchgeführt, bei denen Boué und Boué 1970 die relative Häufigkeit von Chromosomenaberrationen im 1. Trimester feststellten, Ruzicska und Czeiel 1970 die im 2. Trimester und Jakobs 1972 die bei Neugeborenen. Hansmann verglich 1973 die Ergebnisse und stellte sie tabellarisch zusammen (Tabelle 1). Die Tabelle zeigt eine kon kontinuierliche Elimination von Chromosomenaberrationen bis zur Geburt. Außerdem geht aus ihr hervor, daß verschiedene Typen von Chromosomenanomalien zu unterschied-

Tabelle 1

Aberrationstypen (%) unter Spontanaborten des 1. Trimesters (Boué und Boué, 1970) und des 2. Trimesters (Ruzicska und Czeizel, 1970), sowie unter Neugeborenen (Jakobs, 1972); Zusammenstellung nach Hansmann (1973), aus Röhrborn, 1974.

	1. Trimester	2. Trimester	Neugeburten
n untersuchte Fälle	520	55	24468
Aberrationstypen	%[1] chromosomal aberranter Individuen		
45, XO	15,4	25,0	0,8
47, XXX			7,1
47, XXY	0,4		13,5
47, XYY			17,5
Autosomale Monosomien		10,0	
Autosomale Trisomien			
A	1,9		
B	0,7		
C	8,2		
D	14,2		0,8
E	18,0	5,0	2,4
F	0,7	10,0	
G	10,5	5,0	21,4
Doppeltrisomien	3,0	5,0	
3n	19,1		
4n	4,1		
Strukturelle Aberrationen	2,6	40,0	34,1
Insgesamt[2]	51,3	36,4	0,51

[1] Bezogen auf die Gesamtheit der im jeweiligen Zeitraum beobachteten Chromosomenaberrationen.

[2] Bezogen auf die Gesamtheit der Fehlgeburten des 1. bzw. 2. Trimesters, bzw. der Geburten.

lichen Zeiten zu Fehlgeburten führen.

Bis vor ca. 10 Jahren verfügte man nur über wenige Methoden Metaphasechromosomen zu analysieren und Anomalien festzustellen. Man beurteilte z. B. die Länge der Chromosomen oder das Größenverhältnis der einzelnen Chromatiden zueinander. Man versuchte auch auf autoradiographischem Wege Unterscheidungsmerkmale herauszuarbeiten, was aber nur für das fakultative X-Chromosom in weiblichen Zellen gelang.

Erst 1968 entwickelten Caspersson et al. ein Verfahren, welches eine sichere Identifikation von morphologisch gleichaussehenden Chromosomen ermöglichte. Sie färbten ihre Präparate mit quinacrine mustard (QM) und betrachteten sie dann unter dem Fluoreszenz-Mikroskop. Sie entdeckten, daß jedes Chromosom charakteristische hell und dunkel fluoreszierende Banden aufwies und somit eindeutig identifiziert werden konnte. Vor allem in den Jahren 1970 bis 1972 wurden zahlreiche neue Methoden zur Darstellung solcher Bandenmuster entwickelt (Seabright, 1971, Kato und Yosida, 1972, Buckland et al. , 1971), mit denen noch detailliertere Bandenmuster auf Chromosomen erhalten werden. Pathak veröffentlichte 1976 eine Zusammenstellung aller üblichen Verfahren.

Die Banden, die man mit Hilfe verschiedener Methoden auf Säugetierchromosomen darstellen kann, beruhen auf Unterschieden in der Basensequenz der Desoxyribonukleinsäure (DNS) entlang der Chromatiden. Im Bereich der Banden sind vermehrt die Basen Adenosin und Tyrosin zu finden (Schnedl, 1979). Obwohl die Frage nach der Ursache und Signifikanz dieser

bereits lichtmikroskopisch auflösbaren wechselnden Zonen in den Chromosomen noch nicht geklärt ist, sind die charakteristischen Bandenmuster für Diagnostik und Evolutionsforschung von großer Bedeutung.

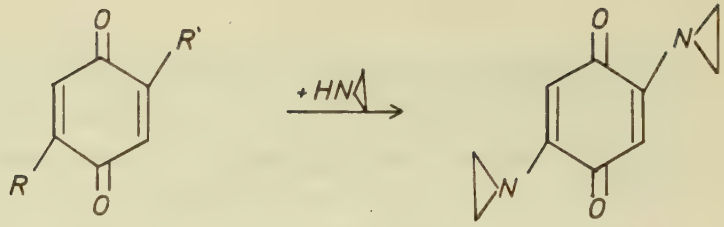
Um bei experimentellen Untersuchungen an Mäusen die chemisch induzierbare Mutationsrate zu bestimmen und die Elimination von mutierten Embryonen während der Embryogenese verfolgen zu können, wurde das Mutagen Trenimon verwendet. Basler et al. (1976) analysierten an weißen Mäusen des Stammes NMRI a) unbefruchtete Metaphase-II-Oocyten, b) vom 2-Zell-Stadium zur Blastula kultivierte Embryonen, c) 9,5 und d) 13,5 Tage alte Embryonen in Bezug auf Absterberate (b,d) und Chromosomenanomalien (a,c,d). Die Ergebnisse zeigen, daß eine kontinuierliche Elimination von Feten und Embryonen mit Chromosomenaberrationen stattfindet und daß aber noch 3,77% der 13,5 Tage alten Embryonen Chromosomenanomalien aufweisen.

Auf die Untersuchungen von Basler et al. (1976) aufbauend, soll die vorliegende Arbeit zur Klärung der Frage beitragen, ob Embryonen mit Chromosomenschäden über den 13,5-ten Tag hinaus lebensfähig sind und falls ja, ob hierbei schwere Chromosomenaberrationen auftreten oder ob Aberrationen erst nach Bänderung der Chromosomen zu entdecken sind.

2. Pharmakologie des Trenimon

2.1. Chemie (Gauss und Petersen, 1963)

Von Gauss und Petersen (1963) wurde die Chemie des Trenimon ausführlich besprochen. Demnach begannen die Bayerwerke in den 50-ziger Jahren mit der Entwicklung von Stoffen, in welchen sie die tumorwachstumshemmende Eigenschaft von Äthylenimin-Derivaten mit der mitosestörenden Wirkung von Chinonen kombinieren wollten.
2,5-Bis-äthylenimino-benzochinon-(1,4)(II) ist der einfachste Vertreter dieser Stoffgruppe und leicht aus p-Benzochinon (I) und überschüssigem Äthylenimin zugänglich (Abb. 1).. Die nähere Prüfung dieses Präparates wurde jedoch wegen unerwünschter Nebenwirkungen abgebrochen, obwohl ein guter zytostatischer Effekt nachgewiesen werden konnte.
Der erste klinisch verwendbare Stoff war dann 2,5-Bis-n-propoxy-3,6-bis-äthylenimino-benzochinon-(1,4)(Bayer E 39). Erfolge mit Bayer E 39 konnten besonders dann erzielt werden, wenn es direkt an den Ort des malignen Geschehens gebracht werden konnte, also bei Hämoblastosen, Pleurakarzinosen und anderen. Jedoch war dieser Stoff in allen gebräuchlichen Lösungsmitteln sehr schlecht löslich, so daß seine Applikation mit großen Schwierigkeiten verbunden war. Das nächste Ziel war jetzt, ein wasserlösliches Derivat zur parenteralen Applikation zu finden.
Durch die Einschiebung von je einem Sauerstoffatom in die Alkylseitenkette von Bayer E 39, wurde dieses Präparat hydrophil. Somit gab es zwei Äthylenimino-chinon-Derivate,

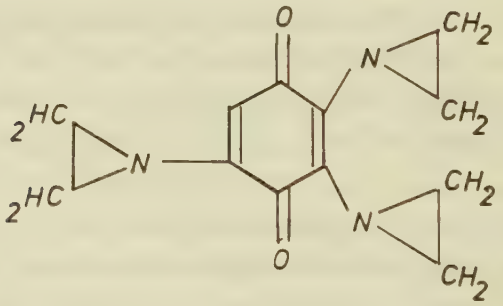


I II

R und R' = H oder Alkoxy (Prüfbezeichnung "Präparat G 4073")

Abb. 1: 2,5 - Bis - äthylenimino - benzochinon (1,4)

Strukturformel:



Summenformel: $C_{12}H_{13}N_3O_2$

Molekulargewicht: 231,3

Schmelzpunkt: 159 - 162°C

Abb. 2: 2,3,5 - Trisäthylenimino - benzo - chinon - 1,4

Bayer E 39 und Bayer E 39 solubile, mit denen therapeutische Erfolge in der Behandlung von malignen Prozessen erzielt wurden.
Bei weiteren Untersuchungen, die das Ziel hatten, noch andere tumorwirksame Präparate zu finden, wurde das Tris-äthylenimino-benzochinon-(1,4)(Trenimon oder Triaziquon, Abb. 2) entwickelt. Dieser gut in Wasser und den üblichen organischen Solventien lösliche Stoff zeigte, daß er allen anderen getesteten Äthylenimino-chinon-Derivaten in seiner zytostatischen Aktivität weit überlegen war (Domagk, 1960). Selbst in einer Verdünnung von 1 : 1 Milliarde ist es in der Lage, die Mitose menschlicher Tumorzellen in Kulturen zu stören (Bierling, 1960). 1961 wurde Trenimon in den Handel gebracht.

2.2 Wirkungsmechanismus

Tumoren decken einen großen Anteil ihres Energiebedarfs aus der Glykolyse. Äthyleniminochinone und von ihnen besonders das Trenimon hemmen die Glykolyse über eine Erniedrigung des Spiegels an Nicotinsäureamidadenin (NAD), dem Coferment der Glycerinaldehyd-Dehydrogenase, so daß es über eine Erniedrigung der Energie zu einer Wachstumshemmung der Tumorzellen kommt. In einem Versuch mit Ehrlichzellen konnte gezeigt werden, daß Trenimon in einer Konzentration von 10^{-5}m Atmung und Glykolyse in den Zellen deutlich hemmte (Pütter, Bierling, 1963). Um ähnliche Ergebnisse bei normalem Gewebe zu erzielen, benötigte man wesentlich höhere Trenimonkonzentrationen. Auch Hölzel (1966) fand, daß unter dem

Einfluß von Trenimon die Glykolyseraten von Tumorzellen sinken. Ferner entdeckte er, daß unter Zusatz von Nicotinamid die Glykolyse zwar wieder auf normale Werte steigt, daß aber gleichzeitig gegebenes ^{14}C-Glycin kaum in die Zellen eingebaut wird. Werden Nicotinamid und Trenimon zusammen gegeben, bleibt die Glykolyse unbeeinflußt, aber der Glycineinbau wird gestört. Pütter (1966) berichtete, daß Tumorzellen nach in vitro Inkubation in glyko.ysehemmenden Trenimonkonzentrationen auch die Fähigkeit verloren, nach Reimplantation wieder anzuwachsen. Besonders bei den sehr empfindlichen Zellen des Yoshida-Tumors beobachtete er, daß die Wachstumsfähigkeit durch kleinere Trenimonkonzentrationen gehemmt werden konnte als die Glykolyse. Die U$_n$tersuchungen von Hölzel (1966) und Pütter (1966) liessen vermuten, daß das Zytostatikum Trenimon nicht nur den Energiehaushalt der Tumorzellen beeinträchtigt, sondern aller Wahrscheinlichkeit nach auch ihren Protein- und Nukleinstoffwechsel. Diese Annahme wurde bestätigt, als Obrecht (1968) herausfand, daß Trenimon den Einbau von H^3- Thymidin in die DNS der Tumorzellen hemmt.

2.3. Mutagenität

Zytostatika sind meist auch chemische Mutagene. Eine der gebräuchlichen Methoden zur Erfassung der mutagenen Wirkung einer Substanz, ist die Messung der Induktion dominanter Letalfaktoren in Tierversuchen.
Dabei wird die zu untersuchende Substanz an die Männchen verabreicht, die dann mit unbehandelten Weibchen verpaart werden (Machemer et al., 1971) oder es werden Weibchen behandelt und mit unbehandelten Männchen verpaart (Röhrborn,

1971). Ergebnisse solcher Versuche zeigen, daß Trenimon in Dosen, bei denen beim Menschen eine tumorhemmende Wirkung auftritt, in den Keimzellen männlicher Mäuse dominante Letalfaktoren in großer Zahl auslöst (Röhrborn, 1967), wobei es besonders auf die postmeiotischen Keimzellstadien der männlichen Maus wirkt (Machemer et al., 1971). Bei weiblichen Mäusen können durch Trenimon in der präovulatorische Phase der Oocyten Chromosomenaberrationen in großer Zahl ausgelöst werden, die in postovulatorischen Metaphase-II-Oocyten entdeckt werden können. Der größte Teil dieser Chromosomenaberrationen konnte auch noch im Zwei-Zell-Stadium nachgewiesen werden (Röhrborn, 1971).
Unter den bekannten Äthyleniminobenzochinonderivaten besitzt Trenimon die höchste zytostatische und mutagene Aktivität (Domagk, 1960, Bierling, 1963). Im Hinblick auf die wirksame Dosis übertrifft es auch Cyclophosphamid (Machemer, 1971), trypaflavin, Endoxan und Hexamethylentetramin (Röhrborn, 1971); Cytoxan (Schleiermacher, 1971).
Trenimon kann in einer Verdünnung von $1:10^6$ bis $1:10^7$ transplantierte Tumorzellen bei Maus, Ratte und Kaninchen am Angehen hindern, in Zellkulturen sogar in einer Verdünnung von $1:10^9$ (Domagl, 1962).
In menschlichen Leukocyten induziert Trenimon in einer Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-6} Mol/l ein breites Spektrum an Chromosomenaberrationen (Gebbart und Bauer, 1970).

2.4. Klinische Anwendung

Die besten therapeutischen Erfolge mit Trenimon erzielt man, wenn es lokal (intrapleural, intraperitoneal, rektal, intratumoral, als Aerosol) zugeführt wird (Witte und Riegg, 1964). Für Systemerkrankungen werden allgemein in der Literatur bessere Erfolge beschrieben als für solide Tumoren (Witte und Riegg, 1964).

Die Dosierung bewegt sich je nach Tumor und Applikationsart zwischen 0,2-1,0mg/Einzeldosis, die dann mehrere Tage hintereinander gegeben werden kann (Trenimon, Bayer-Informationsschrift).

Leukozyten- ujd Thrombozytendepressionen sind die wichtigsten Nebenwirkungen von Trenimon, siehe Bayer-Informationsschrift.

3. Material und Methode

3.1. Versuchstiere

Für die experimentellen Untersuchungen wurden 8 bis 12 Wochen alte weibliche Mäuse des Stammes NMRI verwendet. Die Tiere stammten aus der Zucht der Zentralen Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf. Zur Verpaarung wurden Männchen desselben Stammes genommen.

3.2. Chemikalien

3.2.1. Medikamente

1) PMS (pregnant mares' serum); Intergonan, Vemie Veterinär Chemie
2) HCG (human chorionic gonadotropin); Predalon, Organon GmbH
3) 2,3,5-Trisäthylenimino-benzo-chinon-1,4; Trenimon, Bayer

3.2.2. Medien und Chemikalien für die Kurzzeitkultur

1) MEM: 1x Minimum Essential Medium
   Cat. No. 12-104-49 (1-035D)
   Flow Laboratories
2) Hank' Salt Solution
3) Colchizin (N-desacetyl-N-methyl-colchizin):
   0,5ml einer Stammlösung = 0,33mg auf 100ml Hank's Lösung

4) 1%-ige Natriumcitratlösung

5) Eisessig/Äthanol = 1 : 2,5ml

3.2.3. Lösungen zur Herstellung der mikroskopischen Präparate

1) PBS (phosphate buffered salt solution):

NaCl	16,0 g
KCL	0,4 g
Na_2HPO_4 x 2 H_2O	2,3 g
KH_2PO_4	0,4 g

2 Liter aqua destillata

2) Sörensen Puffer:

a) KH_2PO_4	9,07 g/l	1/15 mol
b) Na_2HPO_4 x 2 H_2O	11,87 g/l	1/15 mol

pH = 6,8: 53,4 ml (a) + 46,6 ml (b)

3) Bacto-Trypsin (Difco Laboratories, Code 0153) entsprechend einer tryptischen Aktivität von 0,05% einer Lösung von Difco Trypsin 1:250

4) Färbelösung:

5 ml Giemsa-Lösung

4 ml Methanol

91 ml Sörensen Puffer, pH = 6,8

3.3 Versuchsaufbau

Zur Einleitung der Brunst wurden die Weibchen der Kontroll- und Versuchsserie mit 1,5 IE PMS und 48 Stunden später zur Stimulation der Ovulation mit 2,0 IE HCG behandelt.

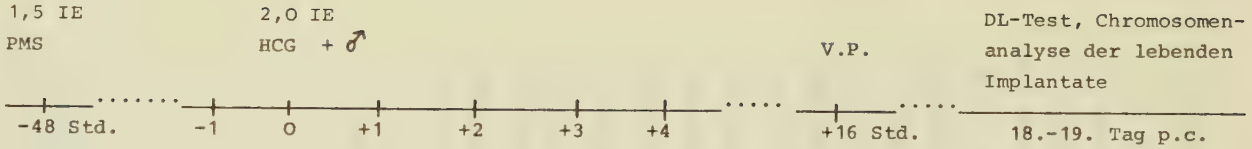
Die Hormone wurden in 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung gelöst und intraperitoneal injiziert. Den Tieren der Versuchsserie wurde 3 Stunden nach der HCG-Gabe zusätzlich die mutagene Substanz Trenimon in einer Konzentration von 0,25 mg/kg Körpergewicht - gelöst in 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung - intraperitoneal appliziert. 1 Stunde später wurden die Weibchen zu den unbehandelten Männchen gesetzt. 16 Stunden nach HCG-Gabe wurde überprüft, ob sich ein Vaginalpfropf gebildet hatte, um sicher zu stellen, daß eine Kopulation stattgefunden hatte. Die Weibchen, die sich verpaart hatten, wurden am 18.-19. Tag post conceptionem abgetötet und ihre Embryonen auf Chromosomenanomalien hin untersucht. Um sicher zu stellen, daß eine Kopulation stattgefunden hatte, wurde 16 Stunden nach der HCG-Gabe überprüft, ob sich ein Vaginalpfropf gebildet hatte. Bei Vorhandensein des Vaginalpfropfes konnte man ziemlich sicher sein, daß eine Befruchtung stattgefunden hatte. Denn ein Vaginalpfropf weist daraufhin, daß bei Ratten und Mäusen mit 98%-iger Wahrscheinlichkeit eine Gravidität eintritt (Campean et al., 1980).
Der zeitliche Aufbau des Versuches ist aus Abbildung 3 zu ersehen.

3.4. Chromosomendarstellung

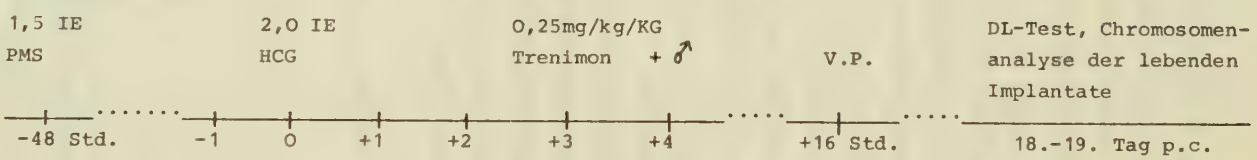
3.4.1. Präparationsmethode

Die im folgenden beschriebene Methode zur Chromosomendarstellung aus embryonalen Mäuselebern ist eine Modifikation der von Datta et al. (1970) beschriebenen Methode:

a) Kontrolle



b) Versuchsserie



DL-Test: Dominant-Letal-Test, Anzahl der toten Implantate
HCG : Human chorionic gonadotropin
PMS : Pregnant mares' serum
V.P. : Vaginalpfropf
p.c. : post conceptionem
IE : Internationale Einheiten

Abb. 3: Versuchsaufbau

a) Das trächtige Muttertier wurde am 18.-19. Tag post conceptionem durch Genickbruch getötet.

b) Die Embryonen wurden freipräpariert und ihre Lebern durch einen Bauchschnitt so schnell wie möglich entnommen.

c) Die Lebern wurden in mit 1 ml MEM gefüllte, vorgewärmte Blockschälchen gelegt und mit einer Schere in 3-4 Stücke geschnitten. Anschließend wurde durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle No. 14 in eine Spritze eine Suspension hergestellt.

d) Die Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen übertragen. Dann wurden 4 ml auf 37°C erwärmtes MEM und Colchizin (0,5 ml einer 0,002%-igen Lösung) zugegeben.

e) Diese Zellsuspension wurde dann im Wasserbad bei 37°C für 2 Stunden inkubiert.

f) Nach Zentrifugation (5 Minuten bei 1500 rpm, Tischzentrifuge) wurden die Zellen in 4-5 ml 1%-iger Natriumcitratlösung aufpipettiert - zwecks hypotoner Behandlung - und für 20 Minuten im 30°C Wasserbad inkubiert.

g) Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Fixierung der Zellen mit Eisessig : Äthanol = 1 : 2,5 ml. Das Sediment wurde mit dem Fixativ aufgenommen und für 30 Minuten in den Kühlschrank gestellt.

h) Nach Zentrifugation wurde erneut fixiert. Diese Suspension blieb dann über Nacht im Kühlschrank.

i) Am nächsten Tag wurde zentrifugiert und das Sediment wurde mit 0,5 - 1,0 ml Fixativ aufgenommen.

j) Diese dichte Zellsuspension wurde auf kalte Objektträger aufgetropft, verblasen, über dem Bunsenbrenner abgeflammt und dann luftgetrocknet.

Vorbereitung der Objektträger

Die Objektträger wurden mit einem Äther/Alkohol-Gemisch (1:1) gereinigt und entfettet. Vor Gebrauch wurden sie über Nacht in Eiswasser gelegt. Vor dem Auftropfen der Zellsuspension wurde das Eiswasser von den Objektträgern abgeschwenkt.

3.4.2. Färbung

Für die Färbung der Chromosomen benutzte ich eine Methode, die Reichert für Oocyten der Maus verwendet (Reichert, persönliche Mitteilung). Allerdings mußten die Zeiten der Originalvorschrift erheblich verändert werden, um bei den Leberzellen der Mäuseembryonen befriedigende Bandenmuster zu erhalten:

a) Die Präparate wurden für 48 Stunden bei 60°C im Brutschrank inkubiert (zwecks Alterung).
b) Die Objektträger wurden für 10 - 25 sec in 0,05%-ige Trypsinlösung gegeben.

Dann erfolgte:

c) 2 x Spülen in PBS
d) Spülen in 70%-igem Alkohol
e) Spülen in absolutem Alkohol
f) Lufttrocknen
g) Färben in filtrierter Giemsa-Lösung für 6 Minuten
h) Spülen in Leitungswasser
i) 2 x Spülen in aqua destillata
j) Lufttrocknen
k) Eindeckeln mit Eukitt

3.5. Auswertungskriterien

Die folgenden Auswertungskriterien gelten gleichermaßen für die Tiere der Kontroll - und Versuchsserie.
Um zu analysieren, ob Embryonen mit chemisch induzierten Chromosomenanomalien über den 13,5-ten Tag hinaus lebensfähig sind, wurde folgendermaßen vorgegangen:
Pro Embryo wurden im Mikroskop 10 Metaphasen ausgewertet, um Chromosomenaberrationen (numerische und strukturelle) festzustellen, die von einer vorgeschädigten Oocyte ausgegangen waren und deshalb in allen Körperzellen des Embryos erscheinen mußten. Die Chromosomen jeder Metaphase wurden gezählt und auf Aberrationen untersucht. Von jedem Embryo wurden 4 gebänderte Metaphasen fotographiert, die Chromosomen ausgeschnitten und nach Größe und Bandenmuster geordnet (gematcht). Auf diesen Chromosomenkarten wurden die einzelnen Chromosomen auf Änderung der Bandenfolge untersucht.

3.6. Fotographische Dokumentation

Die Präparte wurden am Leitz Großfeldmikroskop ORTHOPLAN im Hellfeld mit einem Grünfilter und mit einem Ölimmersionsobjektiv 40x oder 100x begutachtet. Die Negative der Mikrographien wurden mit der Mikroskopkamera ORTHOMAT W von Leitz auf Agfaortho Professional aufgenommen und mit Rodinal (Agfa) entwickelt. Die Bilder wurden auf Agfafotopapier vergrößert und mit dem Rapidoprintverfahren entwickelt und fixiert.

4. Ergebnisse

4.1. Allgemeines

Pro Embryo wurden 5-6 Präparate angefertigt. Zunächst wurden die Chromosomen einer Metaphase der Größe nach geordnet und durchnummeriert. Durch Vergleich der Bandenmuster auf den Chromosomen mehrerer Tiere wurde ein Schema erstellt (Abb. 6), das dann zum Auswerten aller anderen Tiere diente.
Die Zahl der auswertbaren Metaphasen, das heißt, Metaphasen bei denen man jedes einzelne Chromosom gut erkennen konnte, lag bei etwa 50-60 pro Tier, die Zahl der auswertbaren gebänderten Metaphasen (Abb. 4 und 5) lag bei ca. 10 pro Tier. Es wurden nur Chromosomenaberrationen als induziert gewertet, die in allen Metaphasen eines Embryos nachweisbar waren, weil nur dann auf einen Schaden in den Oocyten der Muttertiere geschlossen werden kann und nicht auf Defekte, die durch Kultur und Präparation entstanden sind.

4.2. Kontrolle

Die nicht mit Trenimon behandelten Muttertiere der Kontrollserie wurden am 18.-19. Tag post conceptionem abgetötet, wie aus Abbildung 3 zu ersehen ist. Zunächst wurde im Dominant-Letal-Test (DL-Test) die Anzahl der toten Embryonen bestimmt (Tabelle 2). Von insgesamt 124 untersuchten Implantaten waren 27, das sind 21,8% vor dem Untersuchungstermin gestorben.

Tabelle 2: Der Dominant-Letal-Test.

Sektion am 18. oder 19. Tag p.c..Kontrollserie

n der befruchteten Weibchen	n Implantate	n lebende Implantate	% lebende Implantate	n tote Implantate	% tote Implantate
9	124	97	78,2	27	21,8

n: Anzahl

p.c.: Post conceptionem

Tabelle 3: Lebende Embryonen mit Chromosomenaberrationen

Alter der Embryonen	n der untersuchten Embryonen	n der Embryonen mit Chromosomenaberrationen
18-19 Tage	52	0

n: Anzahl

Da möglicherweise Implantate mit spontanen Mutationen zum Zeitpunkt der Untersuchung noch lebensfähig waren, wurde dann nach Darstellung der Bandenmuster eine Chromosomenanalyse der lebenden Implantate durchgeführt (Tabelle 3). Bei 52 untersuchten Tieren konnte keine Chromosomenaberrationgefunden werden.

4.3. Versuch

Mit Trenimon behandelte Muttertiere wurden am 18.-19. Tag post conceptionem abgetötet und die Embryonen untersucht. Der DL-Test zeigte, daß von 216 Implantaten 95, das sind 43,93% vor dem Untersuchungstermin abgestorben waren (Tabelle 4). Bei 96 der noch lebenden Embryonen wurden Chromosomenaberrationen gesucht.Es konnten keine gefunden werden (Tabelle 5). 25 Tiere konnten wegen mangelhafter Bänderung der Chromosomen nicht ausgewertet werden.

Tabelle 4: Der Dominant-Letal-Test nach Behandlung der Muttertiere mit 0,25 mg/kg/KG.Trenimon.
Sektion am 18. oder 19. Tag p.c.

n der befruchteten Weibchen	n Implantate	n lebende Implantate	% lebende Implantate	n tote Implantate	% tote Implantate
20	216	121	56,02	95	43,93

Abkürzungen siehe Tabelle 2

Tabelle 5: Lebende Embryonen mit Chromosomenaberrationen von mit Trenimon vorbehandelten Muttertieren

Alter der Embryonen	n der untersuchten Embryonen	n der Embryonen mit Chromosomenaberrationen
18-19 Tage	96	0

Abb. 4: Metaphasenzelle und Karyogramm (40, XX) einer Leberzelle aus einer Kurzzeitkultur von embryonalem Mäusegewebe; ein Beispiel aus der Kontrollgruppe

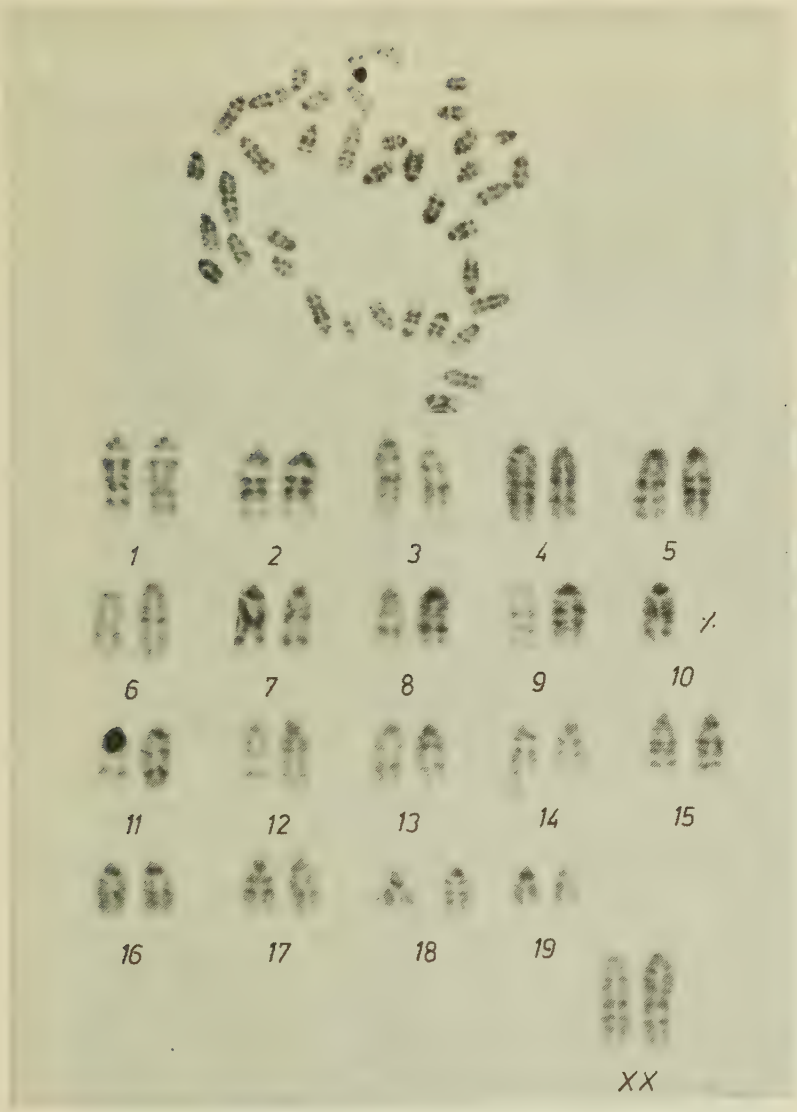


Abb.5: Metaphasenzelle und Karyogramm (39, XX) einer Leberzelle aus einer Kurzzeitkultur von embryonalem Mäusegewebe; ein Beispiel aus der Versuchsgruppe, ein Chromosom Nr. 10 fehlt,

Erklärung siehe Text.

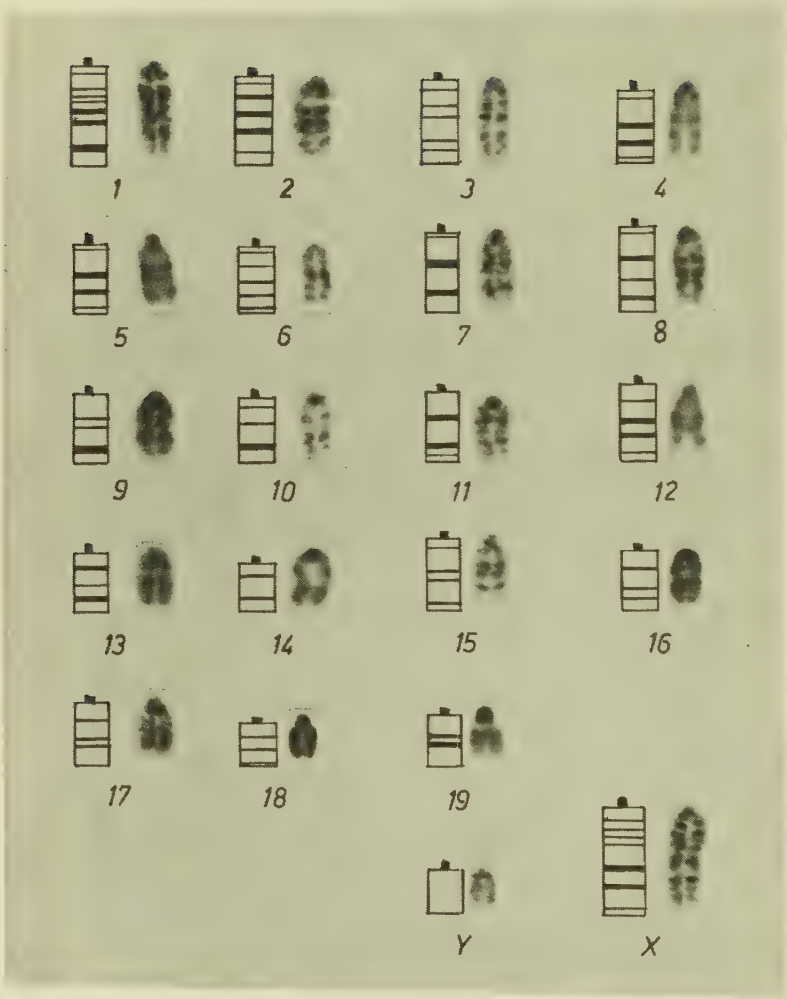


Abb. 6: Schematische und fotographische Darstellung der Bandenmuster der Chromosomen einer Mäuse-Leberzelle.

5. Diskussion

5.1. Färbemethode

Die Bandenmuster wurden mit einer Trypsin-Giemsa-Banding Technik nach Reichert (persönliche Mitteilung) dargestellt, die bislang für das Banding von Metaphase-II-Oocyten-Chromosomen benutzt wurde. Jedoch mußte diese Methode, um eine möglichst große Ausbeute an auswertbaren gebänderten Metaphasen zu erlangen, für die Leberzellen von Mäuseembryonen (18-19 Tage alt) abgewandelt werden:

a) Zunächst wurde die Länge des Zeitraumes zwischen dem Auftropfen der Zellsuspension und dem Inkubieren im Brutschrank variiert. Bei den ersten Versuchen betrug sie bis zu 6 Tagen. Hier konnten kaum gebänderte Metaphasen gefunden werden. Erst als dieser Zeitraum auf ca. 24 Stunden verkürzt wurde, konnten brauchbare Präparate erhalten werden. Dann wurde die Inkubationsdauer von 24 bis 48 Stunden variiert. Die besten Ergebnisse kamen nach 48 stündiger Inkubation zu stande. Deshalb wurden die Präparate nach dem Auftropfen der Zellsuspension einen Tag lang stehen gelassen und dann für 48 Stunden bei 60°C im Brutschrank inkubiert. Aus fast allen Embryonen konnten jetzt zuverlässig genügend Metaphasen gebändert dargestellt werden.

b) Die Zeitdauer der Trypsinierung war nicht genau festzulegen. Sie lag zwischen 10 und 25 Sekunden. Anhand einiger Probetrypsinierungen wurde vor jedem Färbevorgang für jedes Tier die beste Zeit ermittelt. Zeitdifferenzen von 2-3 Sekunden machten zum Teil große Unterschiede in den Ergebnissen der

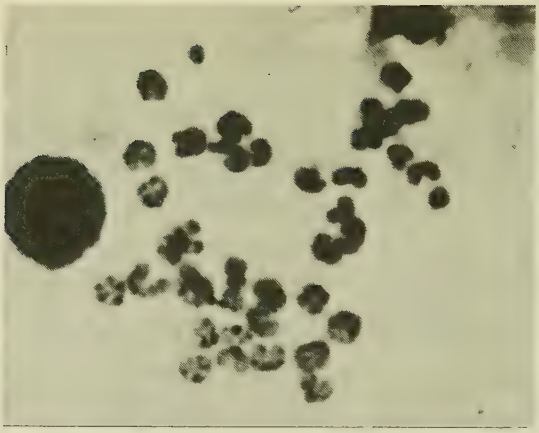


Abb. 7: Unterschiedliche Trypsinwirkung auf die Chromosomen einer Zelle

Bänderung aus.

Trypsin ist unentbehrlich zur Darstellung von Banden auf Chromosomen. Es hat zwei Wirkungen: Proteolyse und Kalziumchelatbildung. Korf et al. (1975) fanden heraus, daß ausschließlich die proteolytische Wirkung für das Giemsa-Banding-Verfahren (G-Banding) von Bedeutung ist. Zwar werden nach Comings et al. (1973) nur 1-2% der chromosomalen Proteine gespalten, das reicht aber aus, die Chromosomen soweit aufquellen zu lassen, daß der Giemsa-Farbstoff angreifen kann. Er induziert dann eine irreversible Änderung in der Struktur der Chromosomen (Schuh et al., 1975), so daß als Resultat Bandenmuster sichtbar werden. Nicht alle Chromosomen einer Metaphase werden durch die Trypsinaktivität gleichstark verändert.(Abb.7). Das hat zur Folge, daß Banden, die sehr schmal sind und eng beieinanderliegen dann als eine breite Bande erscheinen. In den Abbildungen 4 und 5 ist

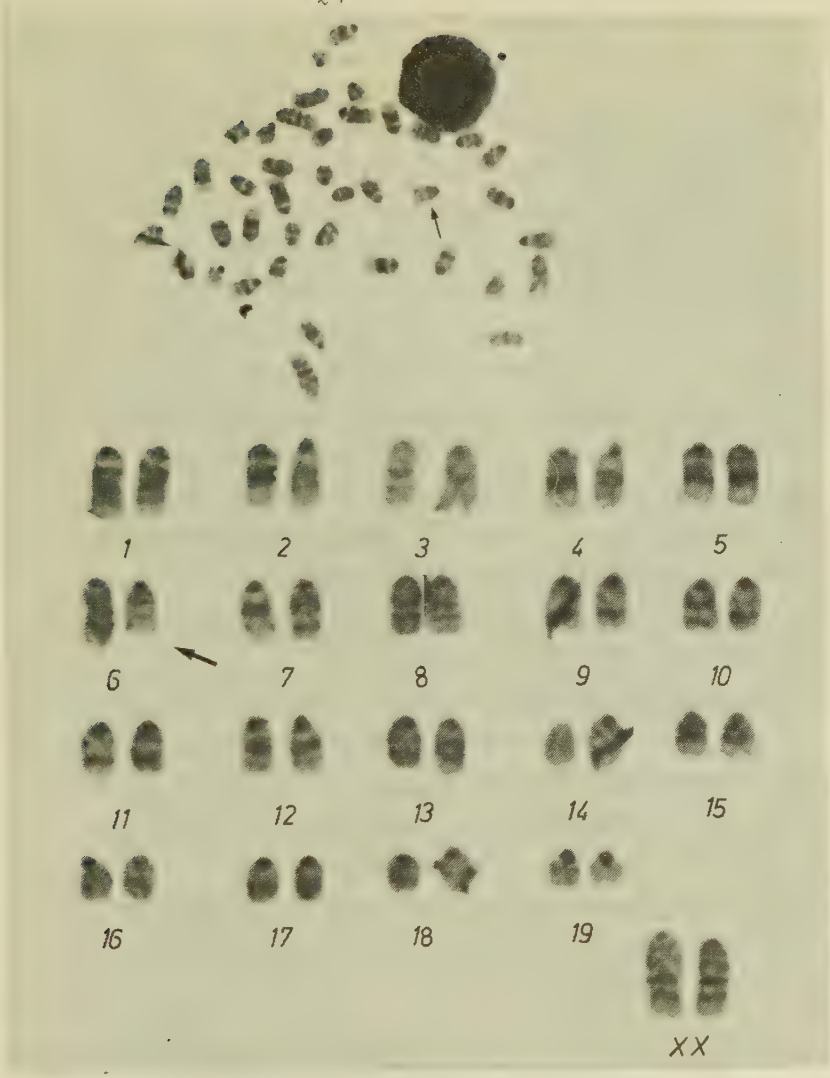


Abb. 8 : Metaphase und Karyogramm (40, XX) einer Leberzelle aus einer Kurzzeitkultur von embryonalem Mäusegewebe. Am Chromosom Nr. 6 (↑) liegt eine Deletion vor: die untere Bande fehlt in beiden Chromatiden.

das deutlich zu erkennen: In Abbildung 5 sind viele schwache Banden gut zu erkennen, z. B. am X-Chromosom und am Chromosom Nr. 1. So viele Banden waren aber nur selten so deutlich sehen. Deshalb konnte auf die Metaphasenzelle in Abbildung 5 nicht verzichtet werden, obwohl hier ein Chromosom fehlt. Die Monosomie des Chromosoms Nr.10 in dieser Zelle ist ganz sicher kein Erbschaden, sondern ein Präparations- oder Kulturartefakt; denn alle andern Zellen dieses Embryos hatten normale Chromosomensätze.
Eine weitere Aberration, die nur in einer Zelle eines Tieres der Versuchsgruppe zu sehen war, betraf das Chromosom Nr. 6 (Abb. 8). Es handelt sich bei der Aberration um eine Deletion, mit der die untere Bande des Chromosoms verlorengegangen ist. Weil diese Aberration aber nur in einer Metaphasenzelle des Embryos gefunden wurde, muß auch sie als Kultur- oder Präparationsartefakt angesehen werden und nicht als Einwirkung des Mutagens auf die Oocyten des Muttertieres. Vergleichbare Bänderungen von Mäusechromosomen wurden 1972 von Wurster beschrieben. Allerdings fand diese Autorin bei manchen Chromosomen einige schmale Banden, die in meinen Färbungen nicht aufgelöst waren. Deshalb fehlen sie im Schema der Abbildung 6.

5.2. Elimination induzierter Chromosomenaberrationen

Boué und Boué, 1970, Ruzicska und Czeizel, 1970, und Jacobs, 1972 untersuchten die Aberrationsrate bei Spontangeburten in verschiedenen Stadien der Embryogenese. Bei Spontangeburten des 1. Trimesters wurden 51,3% Früchte mit Chromosomenab-

errationen gefunden, im 2. Trimester noch 36,4%. Bei Neugeborenen dagegen konnten noch 0,51% Aberrationen nachgewiesen werden. Es findet also beim Menschen eine Elimiation **von Feten und Embryonen mit Chromosomenaberrationen statt, und zwar überwiegend in der frühen Embryogenese.** Viele Untersuchungen, die mit Mäusen gemacht wurden, zeigen ganz ähnliche Ergebnisse. Sehr deutlich sieht man dies bei den Untersuchungen von Basler et al. (1976), ergänzt durch meine. Es wurden verschiedene Stadien der Embryogenese untersucht. Die Muttertiere wurden vor der Verpaarung mit dem starken Mutagen Trenimon behandelt, das für seine Schädigung der Keimzellen bekannt ist (Röhrborn, 1967 und 1971, Machemer et al., 1971). So konnte man von einer hohen **Mutationsrate unter den Embryonen zu Beginn der Entwicklung ausgehen, und eine eventuelle Elimination von - in diesem Fall chemisch induzierten - Chromosomenaberrationen sehr gut untersuchen.**

Das früheste untersuchte Stadium, das der Metaphase-II-Oocyten, zeigte in 76,2% Chromosomenaberrationen (Röhrborn und Hansmann, 1971). Davon erreichten 49,7% das Blastocystenstadium. Geht man davon aus, daß die abgestorbenen 50,3% alle mutant waren, dann findet man noch die Hälfte der Blastocysten mit Chromosomenaberrationen. Der Dominant-Letal-Test, durchgeführt am 13. Tag post conceptionem ergab noch 29,3% lebende Implantate (das entspricht 20,4% toten Implantaten). Insgesamt sind also bis zum 13. Tag der Tragzeit 70,7% der Embryos abgestorben. Wenn 76,2% der Metaphase-II-Oocyten Chromosomenaberrationen aufweisen und 70,7% der Embryonen in der prä- und postimplantativen Phase absterben, kann man davon

ausgehen, daß bis auf eine kleine Anzahl alle Chromosomenaberrationen eliminiert werden. Dies konnte auch experimentell gezeigt werden. So wurden 3,8% Aberrationen unter den lebenden Embryonen 10 Tage und 3,77% 14 Tage post conceptionem gefunden. Es handelte sich um 3 Aneuploidien (39 Chromosomen), 1 strukturelle Anomalie, bzw. 2 Aneulpoidien (39 Chromosomen) und 1 strukturelle Anomalie. Beim Menschen sind Monosomien sehr schwere Chromosomenaberrationen und bis aufdie Monosomie des X-Chromosoms (45, XO-Turner-Syndrom) nicht mit dem Leben vereinbar. Es ist daher interessant, die Entwicklung der chemisch induzierten Aberrationen bis zum Ende der Embryogenese zu verfolgen. Dazu wurden 18-19 Tage alte Embryonen auf Chromosomenaberrationen hin untersucht. Auch nach Darstellung der Bandenmuster konnten nur gesunde Tiere gefunden werden. Da aber bei den 13,5 Tage alten Embryonen noch 3,77% mit Chromosomenaberrationen überlebten, müßte sich die Zahl der toten Implantate im DL-Test bei den 18-19 Tage alten Embryonen erhöhen. Das war auch der Fall; mit 43,93% gab es 2,83% mehr tote Implantate als bei den 13,5 Tage alten Embryonen.

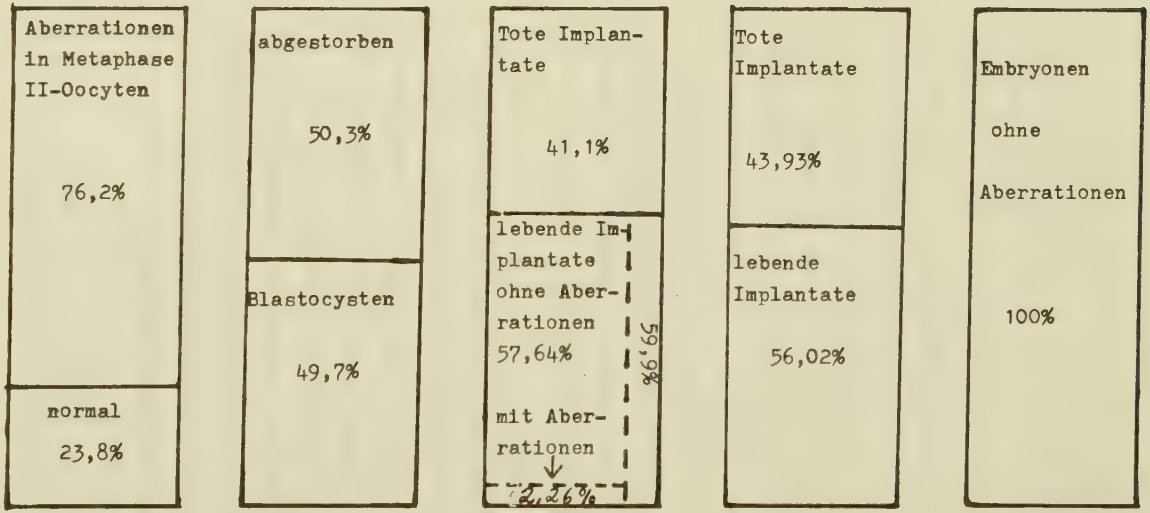
In den Kontrollserien fand eine totale Elimination der Spontanmutationen statt. In Metaphase-II-Oocyten wurden 10% spontane Chromosomenaberrationen gefunden. Nach 60 Stunden Kultivierung waren 12,3% der Blastocysten abgestorben, höchstwahrscheinlich waren die nicht lebensfähigen Blastocysten ausschließlich Chromosomenanomale. Das am Ende der Entwicklungszeit immer noch 21,8% tote Implantate gezählt wurden, mag an der Superovulation, bedingt durch die Hormongabe vor der Verpaarung, liegen. Lebende Implantate zeigten keine Chromosomenaberrationen.

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, daß eine Elimination von mutierten Embryonen während der gesamten Entwicklungszeit stattfindet, daß aber der überwiegende Teil bereits in der frühen Embryogenese abstirbt, während im letzten Drittel der Entwicklung nur noch 3,7% der lebenden Embryonen Chromosomenschäden haben (Abb. 9). Doch auch diese Früchte sterben bis zum Ende der Tragzeit ab.

In den Abbildungen 10 und 11 sieht man, wie stark Trenimon wirkt: Der Uterus unbehandelter Tiere enthält am 18.-19. Tag post conceptionem weit weniger lebende Implantate als der unbehandelter Muttertiere. Bei mit Trenimon behandelten Tieren fanden sich 3-7 lebende Implantate, bei den unbehandelten 15-20. Diese hohe Zahl der Implantate in der Kontrollgruppe erklärt sich dadurch, daß die Weibchen vor der Verpaarung HCG und PMS erhielten, wodurch eine Superovulation ausgelöst wurde. Normalerweise wirft eine Maus 8-10 Junge.

Die experimentellen Untersuchungen an Mäusen sowie Beobachtungen an menschlichen Aborten zeigen, daß eine Elimination von Feten und Embryonen mit Chromosomenaberrationen vorwiegend in der frühen Embryogenese stattfindet, und daß bei Neugeburten keine, bzw. o,51% Chromosomenaberrationen gefunden werden. Dies verdeutlicht, daß mit Hilfe retrospektiver epidemiologischer Studien die mutagene Wirkung von Chemikalien nur in seltenen Fällen zu erfassen sein wird.

Abb. 9: Elimination von induzierten Chromosomenaberrationen während der präimplantativen und postimplantativen Phase, nach Basler et al. (1976)(bis 14. Tag p.c.), durch meine Ergebnisse (18.-19. Tag) vervollständigt



+) Dieses Diagramm faßt die Diagramme III) und IV) der Abb.6 aus der Arbeit von Basler et al. (1976) zusammen.

Abb.10: Uterus einer Maus der Kontrollgruppe

Abb.11: Uterus einer mit Trenimon behandelten Maus,
die Pfeile zeigen auf tote Implantate.

6. Zusammenfassung

Acht bis zwölf Wochen alte weibliche Mäuse des Stammes NMRI wurden mit Trenimon (0,25 mg/kg/KG) behandelt und mit unbehandelten Männchen verpaart. Im Dominant-Letal-Test wurden bei der Versuchsgruppe 43,93% tote Implantate gefunden, bei der Kontrollgruppe waren es 21,8%.
Von lebenden Embryonen wurden nach einer Kurzzeitkultur embryonaler Leberzellen die Chromosomen auf Aberrationen untersucht und mit einer Kontrollgruppe unbehandelter Muttertiere verglichen.
Präparate von 173 Embryonen, davon 121 aus der Versuchsgruppe wurden nach dem Giemsa-Trypsin-Banding-Verfahren gefärbt. Die Karyotypen wurden bestimmt. Unter den 18-19 Tage alten lebenden Embryonen waren keine Mutationen mehr zu finden. Ein Vergleich mit den Ergebnissen anderer experimenteller Arbeiten an Mäusen (Röhrborn und Hansmann, 1971, Basler et al., 1976) zeigt eine vollständige Elimination chemisch induzierter Chromosomenaberrationen während der Embryogenese.

7. Literaturverzeichnis

Basler, A., Buselmeier, B., Röhrborn, G.:
Elimination of spontaneous and chemically induced chromosome aberrations in mice during early embryogenesis.
Hum. Genet. 33 (2) , 121 - 130 (1976)

Bayer-Informationsschrift:
Trenimon^{R}
Prospekt - Nr.: DA 162 - 7115/38159

Bierling, R.:
Symposium aktueller therapeutischer Probleme
3. Heft, Ferd. Enke-Verlag, Stuttgart (1960)

Boué,J.G., Boué,A.:
Les aberrationes chromosomiques dans les avortement spontanés humaines
Presse med. 14 , 635 - 641 (1970)

Buckland, R.A. , Evans, H.J., Summer, A.T.:
Identifying mouse chromosomes with the ASG technique
Exp. Cell Res. 69 , 231 - 236 (1971)

Campean, N., Campean, C., Rosenbauer, K.A.:
Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Vaginalpfropfentstehung bei Laboratoriumstieren
Z. Versuchstierk. 22 , 50 - 62 (1980)

Carr, D.H.:
Chromosome abnormalities and spontaneous abortions
In: Human population cytogenetics (Jacobs, P.A., Price, W.H., Law, P.E.), 103 - 118 Edinburgh: University Press (1970)

Caspersson, T., Farber, S., Foley, G.E., Kudynowski, J., Modest, E.J., Simonsson, E., Wagh, V., Zech, L.:
Chemical differentiation along metaphase chromosomes
Exp. Cell Res. 49 , 219 - 222 (1968)

Comings, D.E., Avelino, E., Okada, T.A., Wyandt, H.E.:
The mechanism of C- and G-Banding of chromosomes
Exp. Cell Res. 77 , 469 - 493 (1973)

Datta, P.K., Frigger, H., Schleiermacher, E.:
The effect of chemical mutagens on the mitotic chromosomes of the mouse, in vivo
In: Vogel, F., Röhrborn, G. (Eds.) Chemical mutagenesis in mammals and man 194 - 213, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1970)

Domagk, G.:
Symposien aktueller therapeutischer Probleme
3. Heft, Ferd. Enke Verlag, Stuttgart (1960)

Domagk, G.:
Bisherige Erfahrungen mit Äthyleniminobenzochinonen zur Behandlung maligner Tumoren im Experiment und in der Klinik
Arch. internat. pharmacodyn. thérap. 140, 688 - 694 (1962)

Gauss, W., Petersen, S.:
Medizin und Chemie
Abhandlungen aus den medizinisch-chemischen Forschungsstätten der Farbenfabriken Bayer AG
Band-VII, Verlag Chemie GmbH Weinheim/Bergstraße (1963)

Gebbart, E., Bauer, D.:
Inter- und intrachromosomale Verteilung von Chromosomentranslokationen nach Einwirkung von Trenimon auf menschliche Leukocyten in vitro
Chromosoma (Berl.) 32, 152 - 161 (1970)

Hansmann, I.:
Chromosomenaberrationen: Häufigkeit, Ursachen und ihre Bedeutung für den Menschen
Zeitschr. f. Allgemeinmed., Landarzt 1408-1417 (1973)

Hölzel, F., Maass, H.:
Biochemische Untersuchungen an Aszitestumorzellen unter der Einwirkung von Trenimon
Dtsch. med. Wschr. 87, 1663 - 1665 (1966)

Jacobs, P.A.:
Chromosome mutations: Frequency at birth in humans.
Hum. genet., 16, 137 - 140 (1972)

Kato, H., Yosida, Th.:
Banding patterns of chinese hamster chromosomes revealed by new techniques
Chromosoma 36, 272 - 280 (1972)

Korf, R., Schuh, B.E., Salwen, M.J., Warburten, D., Miller, O.J.:
The role of trypsin in the pretreatment of chromosomes for Giemsa-Banding
Hum. Genet. 31, 27 - 33 (1976)

Machemer, L., Stenger, E.G.:
Zur Reproduzierbarkeit der Resultate mit Cyclo phosphamid und Triaziquon im Dominant-Letal-Test

an der Maus
Arzneimittel-Forsch. 21, 1037 - 1039 (1971)

Obrecht, P., Richter, M., Oehlert, W.:
Zur Wirkungsweise des Zytostatikums 2, 3, 5-Tris-äthylen-iminobenzochinon-(1,4) auf den Nukleinsäurestoffwechsel
Arzneimittel-Forsch. 18, 151 - 156 (1968)

Pathak, S.:
Chromosome banding techniques
J. Reprod. Med. 17, 25 - 28 (1976)

Pütter, J.:
Die Einwirkung des Trenimons auf Energiestoffwechsel und Wacgstum der Tumorzellen
Med. Welt 42, 2238 - 2240 (1966)

Pütter, J., Bierling, R.:
Über Beziehungen zwischen der Beeinflussung des Energiestoffwechsels und der Wachstumshemmung der Tumorzellen durch Trenimon
Med. und Chem. 7, 676 - 700 (1963)

Röhrborn, G.:
Chromosome aberrations in oogenesis and embryogenesis of mammals and man
Arch. Toxicol. 28, 115 - 119 (1971)

Röhrborn, G.:
Spontane und induzierte Mutationen beim Menschen
In: Handbuch der allgemeinen Pathologie, Band VIII 465 - 518, (Vogel, F.), Springer-Verlag (1974)

Röhrborn, G., Hansmann, I.:
Induced chromosome aberrations in unfertilizid

oocytes of mice
Hum. Genet. 13, 184 - 198 (1971)

Röhrborn, G., Vogel, F.:
Mutationen durch chemische Einwirkung bei Säugern und Mensch. Genetische Untersuchungen an der Maus.
Dtsch. med. Wschr. 92, 2315 - 2321 (1967)

Ruzicska, P., Czeizel, A.:
Cytogenetic studies on mid-trimester abortuses
Hum. Genet. 10, 273 - 297 (1970)

Schleiermacher, E.:
Chromosome aberrations in mitosis and meiosis in vivo
Arch. Toxicol. 28, 105 -114 (1971)

Schnedl, W.:
Die Bänderung der Chromosomen
Referat auf der 74. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft in Regensburg 1979

Schuh, B.E., Korf, B.R., Salwen, M.J.:
Dynamic aspects of Trypsin-Giemsa-Banding
Hum. Genet. 28, 233 - 237 (1975)

Seabright, M.:
A rapid banding technique for human chromosomes
Lancet ii, 971 - 973 (1971)

Witte, S., Riegg, H.:
Klinische Beobachtungen bei der Behandlung maligner Erkrankungen mit Tris- äthylenimino-benzochinon (Trenimon)
Med. Welt 47, 2545 - 2550 (1964)

Wurster, D.H.:

Mouse chromosomes identified by Trypsin-Giemsa-Banding

Cytogenetics 11, 379 - 387 (1972)

Danksagung

Ich danke Professor G. Röhrborn für die Überlassung des Themas und Doktor A. Basler für die Betreuung der Arbeit. Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau H. Ricken für viele freundliche Ratschläge im Labor.

Lebenslauf

Ich wurde am 29.10.1954 in Bremen als zweites Kind der Eheleute Rudi und Duschanka Friedrich geboren.
Von 1961 bis 1966 besuchte ich die Volksschule An der Kirchenallee. 1966 wechselte ich auf das Gymnasium Am Waller Ring über. 1973 bestand ich dort das Abitur.
Vom 1.6. bis 31.7.1973 und vom 1.12.1973 bis 31.3.1974 arbeitete ich als Krankenpflegehelferin im Krankenhaus St.-Jürgen-Straße.
Im April 1974 begann mein Medizinstudium an der Universität in Düsseldirf. Im März 1976 bestand ich die Ärztliche Vorprüfung, im März 1977 den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, im März 1979 den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und im Mai 1980 das Staatsexamen.

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen